

<http://v3.espacenet.com/textdoc?PRT=yes&sf=a&FIRST=1&CY=ep&LG=en&DB=EPOD...> 1/7/2004

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-108675

(43) 公開日 平成10年(1998) 4月28日

(51) Int.Cl. ⁹	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 H 21/04		C 0 7 H 21/04	B
C 0 7 K 14/34		C 0 7 K 14/34	
C 1 2 N 1/21		C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/02		C 1 2 P 21/02	C

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-265661

(22) 出願日 平成 8 年(1996) 10月 7 日

(71) 出願人 000000066

味の素株式会社

東京都中央区京橋 1 丁目15番 1 号

(72) 発明者 白田 佳弘

神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の
素株式会社中央研究所内

(72) 発明者 川崎 寿

神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の
素株式会社中央研究所内

(72) 発明者 宇多川 隆

神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の
素株式会社中央研究所内

(54) 【発明の名称】 コリネバクテリウム・アンモニアゲネス由来の新規な細胞表面蛋白質

(57) 【要約】

【課題】 コリネバクテリウム・アンモニアゲネスにおいてアミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質の発現及び分泌のための新たな系を提供する。

【解決手段】 コリネバクテリウム・アンモニアゲネスに由来し、細胞表面蛋白質をコードするDNA (a)、コリネバクテリウム・アンモニアゲネスに由来するプロモーター配列、リボゾーム結合配列、シグナル配列のいずれかまたはすべてを含むDNA (b)、前記DNA

(b)の下流に有用蛋白質をコードする構造遺伝子が連結されて得られるDNA、前記DNA (b)の下流に前記DNA (a)が連結され、さらにその下流に有用蛋白質をコードする構造遺伝子が連結されて得られるDNA、前記DNAとベクターが連結されて得られる組換えDNA、および前記DNAが導入された微生物。さらには、前記微生物を培地に培養し、有用蛋白質を細胞外に分泌させることを特徴とする有用タンパク質の製造法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コリネバクテリウム・アンモニアゲネスに由来し、配列表配列番号4に記載されるアミノ酸配列において1番目のアラニン残基から333番目のフェニルアラニン残基までの配列を含む、細胞表層蛋白質をコードするDNA。

【請求項2】 コリネバクテリウム・アンモニアゲネスに由来し、配列表配列番号4に記載される塩基配列において1番目のアデニン残基から601番目のグアニン残基までの配列中に存在するプロモーター配列、リボゾーム結合配列、シグナル配列のいずれかまたはすべてを含むDNA。

【請求項3】 請求項2記載のDNAの下流に有用蛋白質をコードする構造遺伝子が連結されて得られるDNA。

【請求項4】 請求項2記載のDNAの下流に請求項1記載のDNAが連結され、さらにその下流に有用蛋白質をコードする構造遺伝子が連結されて得られるDNA。

【請求項5】 請求項3または4記載のDNAとベクターが連結されて得られる組換えDNA。

【請求項6】 請求項3ないし5記載のDNAが導入された微生物。

【請求項7】 請求項6記載の微生物を培地に培養し、有用蛋白質を細胞外に分泌させることを特徴とする有用タンパク質の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、アミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質の発現及び分泌に関する。

【0002】

【従来の技術】コリネバクテリウム属細菌を用いて有用蛋白質を発現分泌させる試みは、コリネバクテリウム・グルタミカムにおいて知られている(WO93/03158)。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】コリネバクテリウム・アンモニアゲネスにおいてアミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質の発現及び分泌のための新たな系を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス由来の細胞表層蛋白質の発現・分泌のしくみに着目し、そのプロモーター配列、リボゾーム結合配列、シグナル配列および構造遺伝子を単離し、構造を解析することによって本発明を完成するに至った。

【0005】すなわち、本発明は、コリネバクテリウム・アンモニアゲネスに由来し、細胞表層蛋白質をコードするDNA(a)である。また、本発明は、コリネバクテリウム・アンモニアゲネスに由来するプロモーター配

列、リボゾーム結合配列、シグナル配列のいずれかまたはすべてを含むDNA(b)である。さらに、本発明は、前記DNA(b)の下流に有用蛋白質をコードする構造遺伝子が連結されて得られるDNAである。さらに、本発明は、前記DNA(b)の下流に前記DNA(a)が連結され、さらにその下流に有用蛋白質をコードする構造遺伝子が連結されて得られるDNAである。さらに、本発明は、前記DNAとベクターが連結されて得られる組換えDNAであり、前記DNAが導入された微生物である。本発明は、前記微生物を培地に培養し、有用蛋白質を細胞外に分泌させることを特徴とする有用タンパク質の製造法である。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明のコリネバクテリウム・アンモニアゲネスに由来するプロモーター配列、リボゾーム結合配列、シグナル配列、細胞表層蛋白質をコードするDNAは、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス由来で細胞表層蛋白質をコードする遺伝子であればいずれの遺伝子からのものも用いることができる。コリネバクテリウム・アンモニアゲネスとしてはコリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 6872
コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 6871

などがある。コリネバクテリウム・アンモニアゲネスに由来するプロモーター配列、リボゾーム結合配列、シグナル配列は、例えば配列表配列番号4に記載される塩基配列において1番目のアデニン残基から601番目のグアニン残基までの配列中に存在する。コリネバクテリウム・アンモニアゲネスに由来する細胞表層蛋白質をコードするDNAは、例えば配列表配列番号4に記載されるアミノ酸配列において1番目のアラニン残基から333番目のフェニルアラニン残基までの配列を含むものがあ

る。
【0007】コリネバクテリウム・アンモニアゲネスに由来するプロモーター配列、リボゾーム結合配列、シグナル配列、細胞表層蛋白質をコードするDNAは、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 6872株の染色体DNAから、以下のようにして得ることができる。

【0008】まず、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 6872株を培養し、培養液あるいは菌体抽出物から細胞表層蛋白質を精製し、N末端のアミノ酸配列を決定する。具体的にはソディウムドデシルサルフェートポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)の後ポリビニリデンフルオリド(PVDF)膜に転写し、アミノ酸解析を行うことができる。コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 6872株から得られる分子量46,000Daの蛋白質のN末端アミノ酸配列は配列表配列番号1に示す通りである。

【0009】次に、適当な制限酵素で切断された染色体DNA断片をカセットと呼ばれる二本鎖のオリゴヌクレオチドと連結し、N末端のアミノ酸配列をもとに合成されたオリゴヌクレオチドと、カセットの配列を基に合成されたオリゴヌクレオチドとをプライマーとして用いてポリメラーゼ・チェーン・リアクション法（PCR法）を行うことにより、目的DNA断片を取得できる（Molecular and Cellular Probes, 6, 467 (1992)）。プライマーとしては、塩基組成がランダムでG+C含量が50%付近であり、特殊な2次構造を形成せず、プライマー同士が互いに相補的でない、との条件を満たすものであり、長さは通常18ないし30塩基のものがよく用いられる。プライマーの配列は具体的に例示すると、配列表配列番号2および3に示すようなものが挙げられる。

【0010】PCR法によって増幅されたDNA断片をベクターに連結して組換えDNAとしてクローニングを行う。ベクターとしてはエシェリヒア・コリ由来のベクター、例えば、pUC19、pBR322等が用いられる。作成した組換えDNAの受容菌としては、ベクターの複製に好適なものであればいずれの菌株でもよく、例えばHB101、JM109、DH5等のエシェリヒア・コリ菌株が用いられる。

【0011】上記で得られたDNAは細胞表層蛋白質構造遺伝子を含むが、同時にプロモーター配列、リボゾーム結合配列およびシグナル配列を含む構造遺伝子上流の機能性配列を得ることができる。具体的には、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス染色体DNAを適当な制限酵素で切断した物をエシェリヒア・コリ由来のベクターに連結し、これで適当な受容菌を形質転換する。コロニーハイブリダイゼーション法により、形質転換されたエシェリヒア・コリのうち、ラベルした細胞表層蛋白質構造遺伝子断片とハイブリダイズする組換えDNAを有するものを選択する。

【0012】選択された形質転換体から組換えDNAを抽出し、挿入された断片の塩基配列を決定することで細胞表層蛋白質構造遺伝子および構造遺伝子上流の機能性配列を決定することが出来る。決定された2323塩基対の塩基配列と、そこにコードされる細胞表層蛋白質のアミノ酸配列を配列表配列番号4に示した。細胞表層蛋白質は358アミノ酸残基からなり、333アミノ酸残基からなる成熟蛋白質と、そのN末端側に位置する25アミノ酸残基のシグナルペプチドとからなる。成熟蛋白質の分子量は36、654Daと計算される。予想されるアミノ酸配列を蛋白質データベース（NBRF）上で検索したところ、新規蛋白質であることが判明した。

【0013】リボゾーム結合配列は翻訳開始点の数塩基上流にあることが知られていることから推定することができる（Nature, 254, 34 (1975)）。配列表配列番号4に記載される塩基配列においては、463番目のシトシン残基から468番目のチミン残基までの領域である。

【0014】また、プロモーター配列は転写開始点の数塩基上流にあることが知られていることから、公知の方法によって転写開始点を決定し、決定される転写開始点の情報に基づいて推定できる。転写開始点の決定法は、例えばプライマー伸張法によって決定できる。配列表配列番号4に記載される塩基配列においては、438番目のチミン残基から444番目のチミン残基までの領域である。

【0015】こうして得られた、コリネバクテリウム・アンモニアゲネスに由来し、プロモーター配列、リボゾーム結合配列、およびシグナル配列の下流に、有用蛋白質をコードする構造遺伝子とを連結し、さらにこれとベクターDNAとを連結して組換えDNAを得る。

【0016】本発明の有用蛋白質は特に限定されないが、例えば、酵素、生理活性蛋白質などがあげられ、由来も、微生物、植物、動物等のものが用いられる。天然に存在する蛋白質であってもよく、人工的に変異が導入された蛋白質であってもよい。

【0017】ベクターDNAとは、DNAを人為的に細胞に導入するためのいわゆる「運び屋」である。これには、プラスミド、ファージ、トランスポゾン等がある。コリネバクテリウム属細菌で機能するベクターとしては、pHM1519、pAM330等のプラスミドベクターがあり、トランスポゾンをベクターとして用いた例は特表平5-818151号公報に記載されている。

【0018】コリネバクテリウム・アンモニアゲネス由来のシグナル配列と、有用蛋白質との間に、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス由来の細胞表層蛋白質構造遺伝子全部またはN末端側一部分をコードするDNAを挿入しても良い。該挿入によって有用蛋白質の発現・分泌が効率的になる場合がある。ただし、分泌される有用蛋白質はコリネバクテリウム・アンモニアゲネス由来の細胞表層蛋白質との融合蛋白質となるので、ペプチダーゼを用いて不要な部分を除去する工程が必要となる場合がある。

【0019】組換えDNAは公知の方法によって宿主細胞に導入される。宿主細胞としては、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 6872
コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 6871
などがある。

【0020】組換えDNAが導入された形質転換体を適当な培地で培養して、有用蛋白質を細胞外に分泌させ、これを回収する。形質転換体を培養する培地、培養方法、有用蛋白質の回収方法はいずれも公知の方法を採用できる。

【0021】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。なお、制限酵素は市販品（宝酒造社製）を用いた。

【0022】実施例1 (コリネバクテリウム・アンモニアゲネス由来の細胞表層蛋白質のN末端アミノ酸配列の決定)

コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 6872株をグルコース20g/l、硫酸マグネシウム0.5g/l、リン酸1カリウム1g/l、リン酸2カリウム3g/l、塩化カルシウム0.01g/l、硫酸鉄0.01g/l、硫酸マンガン0.005g/l、チアミン塩酸塩0.01g/l、パントテン酸カルシウム0.01g/l、ビオチン30μg/l、硫酸アンモニウム5g/l、イーストエキストラクト1g/l、尿素2g/lからなる培地で32℃、24時間培養した。この培養液400mlから遠心分離により集菌し、得られた菌体を20mlの50mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.5)、2% SDSに懸濁し、100℃で5分間処理した。この処理液を遠心分離し上清を細胞壁画分とした。細胞壁画分をSDS-PAGEで解析したところ最も多量な蛋白質として、分子量46,000の蛋白質が検出された。細胞壁画分40μlをSDS-PAGEで分画した後、PVDF膜(ミリポア社製)にセミドライブロットングした(遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析東京化学同人(1993))。PVDF膜をクマシーブリリアントブルー染色した後、脱染、風乾した。分子量46,000の蛋白質部分を切り取り、プロテインシークエンサー(モデル476A、パーキン・エルマー社製)でN末端アミノ酸配列の解析を行った。決定したアミノ酸配列を配列表配列番号1に示した。29アミノ酸残基のうち2アミノ酸残基は同定できなかった。

【0023】実施例2 (コリネバクテリウム・アンモニアゲネス由来の細胞表層蛋白質遺伝子の取得)

N末端アミノ配列から推定される塩基配列中で縮重の少ない部位を選びプライマーを作製した。作製したプライマーの配列を配列表配列番号2および3に示した。鋳型としては、斉藤、三浦の方法(Biochem. Biophys. Acta., 72, 619, (1963))により調製したコリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 6872株染色体のEcoRI切断断片とカセットとの連結物を調製した。反応には宝酒造社製LA インビトロ クローニングキットを用い、反応条件は供給者の指示に従って行った。約1,900塩基の特異的なバンドの増幅が認められた。この断片をガラスパウダー(宝酒造社製)を用いて回収した。増幅された遺伝子断片をプローブとしてコリネバクテリウム・アンモニアゲネス染色体をMolecular Cloning 2nd edition (J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, p9.31(1989))記載のサザンハイブリダイゼーション法により解析したところEcoRI切断により6,300塩基のバンドが検出された。コリネバクテリウム・アンモニアゲネス染色体のEcoRI切断断片をアガロー

スゲル電気泳動の後、目的の長さ周辺の断片を回収、pMW218(日本ジーン社製)に連結し、Molecular Cloning 2nd edition (J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, p1.90(1989))記載のコロニーハイブリダイゼーション法により目的遺伝子断片の選択を行い、同断片を含むプラスミドpMWE6.3を得た。この断片の制限酵素地図を図1に示した。この断片のうち目的遺伝子を含むと考えられた700塩基のHindIII切断断片と1,600塩基のHindIII-EcoRI切断断片をpUC18(宝酒造社製)に挿入した。これらの断片の塩基配列を決定し、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス由来の細胞表層蛋白質構造遺伝子の塩基配列及びその機能性配列の塩基配列を明らかにした。塩基配列の決定は、ダイターミネーター サイクル シークエンシング キット(パーキン・エルマー社製)とDNAシークエンサー(モデル373A、パーキン・エルマー社製)を用いて行った。

【0024】実施例3 (プライマー伸張法による転写開始点の決定)

コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 6872株を実施例1記載の培地に植菌し、32℃で5時間培養した。この培養液100mlを遠心分離により集菌した。この菌体からISOGEN(日本ジーン社製)を用いてその指示に従って全RNA抽出を行った。得られた全RNA濃度は0.2g/lであった。配列表配列番号5に示した配列のプライマーを合成し、[γ-32P] ATPとT4ポリヌクレオチドキナーゼによって末端標識を行った。全RNA10μgに対し、10pmolのラベルしたプライマーを混合し、40℃で12時間アニールした。これを10UのAMV逆転写酵素(プロメガ社製)と混合し、逆転写反応を行った。反応にはリバーストランスクリプション システム(プロメガ社製)を用いて、反応条件はその指示に従った。Molecular Cloning 2nd edition (J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, p7.79(1989))記載の方法に従って、変性ゲルにて反応物を解析し、転写開始点を決定した。その結果、転写開始点は配列表配列番号4に記載される塩基配列の454番目のシトシン残基であった。

【0025】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 29

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 蛋白質

フラグメント型: N末端フラグメント

起源

生物名: コリネバクテリウム・アンモニアゲネス (Cory

nebacterium ammoniagenes)

株名: ATCC6872

配列

Ala Glu Lys Thr Pro Ala Asp Ile Ala Gly Asp Thr Ala Leu Ser

1 5 10 15

Glu Ile Gln Glu Leu Xaa Val Asp Ser Thr Ile Xaa Gly Gln

20

25

【0026】配列番号: 2

鎖の数: 一本鎖

配列の長さ: 20

トポロジー: 直鎖状

配列の型: 核酸

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列

GARAARACNC CNGCNGAYAT

20

【0027】配列番号: 3

鎖の数: 一本鎖

配列の長さ: 20

トポロジー: 直鎖状

配列の型: 核酸

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列

GAYATHGCNG GNGAYACNGC

20

【0028】配列番号: 4

特徴を表す記号: RBS

配列の長さ: 2323

存在位置: 463..468

配列の型: 核酸

特徴を決定した方法: P

鎖の数: 二本鎖

配列の特徴

トポロジー: 直鎖状

特徴を表す記号: CDS

配列の種類: Genomic DNA

存在位置: 479..1552

起源

特徴を決定した方法: P

生物名: コリネバクテリウム・アンモニアゲネス (Cory

配列の特徴

nebacterium ammoniagenes)

特徴を表す記号: sig peptide

株名: ATCC6872

存在位置: 479..553

配列の特徴

特徴を決定した方法: P

特徴を表す記号: -10 signal

配列の特徴

存在位置: 438..444

特徴を表す記号: mat peptide

特徴を決定した方法: E

存在位置: 554..1552

配列の特徴

特徴を決定した方法: P

配列

AAGCTTTGCC CAGAAGCCCA AAATTGAGAT TTGTTCCATG ATAAATGAAC TTTTCGGTTT 60

TGGGATTCGG TCCACGCGCC GTCAAGAGCC TGAAAAGATT ATGACATATT TGTCACATTC 120

GCACCAGCAG TCCTGCCATT CTACTGTTAA GCTGTCTGTG TCCCTTCTCT TATGCTCCAT 180

CTTTGCTAGA AGTCATACAG GTTCTTTTAA CAGGCTTTTG AGAAACTCCC CTTTCCAGCT 240

CCAAAACCCG TTAGCCTAGG AGATTTTGGG AACTGATAAC GAAATCTGGA TAGTCTGCGA 300

TAATTAACA GCGGAATAAT ATCTCGCACC TAGTCATTTT TCAGGTATCT GATAGAAATG 360

AAGCGAOGCC TTGTTTTCGT AGGGATTCT TCTACGTTTG CGCGTTGTGA AGAACTAGCA 420

GAGGATTAAT CGGAACCTTC CATTCCCTTA ACTCACACAG AACGGAATAA TTAACACC 478

ATG AAA CGC ATG AAA TCG CTG GCT GCG GCG CTC ACC GTC GCT GGG GCC 526

Met Lys Arg Met Lys Ser Leu Ala Ala Ala Leu Thr Val Ala Gly Ala

-25 -20 -15 -10

ATG CTG GCC GCA CCT GTG GCA ACG GCA GCA GAA AAA ACT CCT GCT GAT 574

Met Leu Ala Ala Pro Val Ala Thr Ala Ala Glu Lys Thr Pro Ala Asp

-5 1 5

ATC GCT GGA GAC ACT GCA CTG TCT GAG ATT CAG GAA TTG GAA GTT GAC 622

Ile Ala Gly Asp Thr Ala Leu Ser Glu Ile Gln Glu Leu Glu Val Asp

10

15

20

TCC ACA ATT GAA GGG CAG AAG TGG TAC CAA AAG TAC GCA GAT GAT GAG	670
Ser Thr Ile Glu Gly Gln Lys Trp Tyr Gln Lys Tyr Ala Asp Asp Glu	
25 30 35	
CGG GTG CTC AAG CTT CAA GCG ACC TCC CCA GCA ATG GAT GGT CGT AAG	718
Arg Val Leu Lys Leu Gln Ala Thr Ser Pro Ala Met Asp Gly Arg Lys	
40 45 50 55	
GTT CCG CTC GCC ATC ATT CCG GCT CAA AAC CCA GAC CGT CCA ACG ATC	766
Val Pro Leu Ala Ile Ile Arg Ala Gln Asn Pro Asp Arg Pro Thr Ile	
60 65 70	
TAC CTG CTC AAC GGC GCA GGC AGC GCT GAG CAG GAT ACA GAC TGG TTG	814
Tyr Leu Leu Asn Gly Ala Gly Ser Ala Glu Gln Asp Thr Asp Trp Leu	
75 80 85	
AAC CAG TCG GAG GCA GTA GAC TTC TAC GCC GAT AAA GAC GTA AAC GTC	862
Asn Gln Ser Glu Ala Val Asp Phe Tyr Ala Asp Lys Asp Val Asn Val	
90 95 100	
GTT ATT CCC CAG GCC GGT GCG TTT TCT TAC TAC ACC GAC TGG AAC ACC	910
Val Ile Pro Gln Ala Gly Ala Phe Ser Tyr Tyr Thr Asp Trp Asn Thr	
105 110 115	
ACC CCT AAT AAG AGC TAC CTG AAG GGC CCG CAG AAG TGG GAG ACC TTC	958
Thr Pro Asn Lys Ser Tyr Leu Lys Gly Pro Gln Lys Trp Glu Thr Phe	
120 125 130 135	
TTG ACC AAG GAA CTA CCT GGT CCA CTG GAA GAG CGT CTG CAG TCC AAT	1006
Leu Thr Lys Glu Leu Pro Gly Pro Leu Glu Glu Arg Leu Gln Ser Asn	
140 145 150	
AAC AAG CGC GCA ATT GCA GGC ATG TCC ATG TCT GCT ACC TCT TCC CTA	1054
Asn Lys Arg Ala Ile Ala Gly Met Ser Met Ser Ala Thr Ser Ser Leu	
155 160 165	
TTA TTG GCT CAG CAC AAT CAG GGC TTC TAC GAT GCA GTT GGC TCC TAT	1102
Leu Leu Ala Gln His Asn Gln Gly Phe Tyr Asp Ala Val Gly Ser Tyr	
170 175 180	
GCT GGG TGT GCT GGT ACC TCC ACG CCA TTT GAG TAC GAG GCT ATG CGC	1150
Ala Gly Cys Ala Gly Thr Ser Thr Pro Phe Glu Tyr Glu Ala Met Arg	
185 190 195	
CTG ACT GTG AAC CGT GGT GGT GGC GAG CCA GAG CAG ATG TGG GGC AAG	1198
Leu Thr Val Asn Arg Gly Gly Gly Glu Pro Glu Gln Met Trp Gly Lys	
200 205 210 215	
ATG GGA TCT CGC ACC AAT CGC TAT AAT GAT GCG CTG CTG AAC TCC GAC	1246
Met Gly Ser Arg Thr Asn Arg Tyr Asn Asp Ala Leu Leu Asn Ser Asp	
220 225 230	
AAG CTG CGT GGC ACC GCA CTG TAC ATC TCC TCG GGC AAT GGC CTG CCA	1294
Lys Leu Arg Gly Thr Ala Leu Tyr Ile Ser Ser Gly Asn Gly Leu Pro	
235 240 245	
GGT GAG ACT GAC ATG CCT TCC TAC TAC ACC AAG CAG GGT GTA GAC CCA	1342
Gly Glu Thr Asp Met Pro Ser Tyr Tyr Thr Lys Gln Gly Val Asp Pro	
250 255 260	
ACC ACA GCT TCC GTT GGC GCA GCT ACC TTG CAG ATT GAA GGC GGC ATC	1390
Thr Thr Ala Ser Val Gly Ala Ala Thr Leu Gln Ile Glu Gly Gly Ile	
265 270 275	
ATC GAA GCT GGC GTA AAC CAC TGC ACT CAC AAC TTG GAA GCC AAA CTG	1438
Ile Glu Ala Gly Val Asn His Cys Thr His Asn Leu Glu Ala Lys Leu	


```

280          285          290          295
AAG AGC CAG AAC ATC CCA GCT ATC TAC AAC TTC CGC GAC ACC GGC ACC 1486
Lys Ser Gln Asn Ile Pro Ala Ile Tyr Asn Phe Arg Asp Thr Gly Thr
          300          305          310
CAC TCT TGG CCG GGC TGG CGC GAA GAC TTG GAG AAG TCG TGG CCA GTA 1534
His Ser Trp Pro Gly Trp Arg Glu Asp Leu Glu Lys Ser Trp Pro Val
          315          320          325
TTT GAA AAG GCA CTC TTC TAATTCGA 1560
Phe Glu Lys Ala Leu Phe
          330
GTTGAGCCAG ATTAGGTAGA AACCTAAAGG GCGGTAGAAT TGCAGCATCA TGAAATCGCT 1620
GCTTCTTACC GCCCTTCGGC GTTATCCGG GGAATTTACA GACCTTACA CCGGTATTGA 1680
TTACAACGTC GGCTTTTCCA TCTACCATTA TGATTTGGAA TTGGTCTACC GGGTTGAGCC 1740
GAATTTACTC TCCGGCGTTG CCCACCTGCA CATTTCATG GCAGAGGACT TAGACAATCT 1800
CACGCTAGAT TTGGGCGGAG CGATGGCGC GCGTCGCATC TCGGCTAATA AGCACATCAA 1860
AATTACGCGC TTTCGCCAAT CCGGCGGCAA GATCCGCGTC GCTTTTGATG AGGTTATCGA 1920
AGCTGGAACA GAGTTTGTCC TGA CTGCTGCGC CTACGGCGGC AATCCGCGTC CAATTCGCAC 1980
GACGTGGGGT GAAATCGGCT GGGAAGAAAC CGAGTCTGGT GCTCTCGTTG CATCACAGCC 2040
CAATGGGCGC CCGAGCTGGT TCCCGTGTGA CGACACCCCC AGTGAAAAAG CCACCTATGA 2100
CATCGGTGTG ACCGCGGATG ATCCCTTCAC TGTGATATCC AACGGCACTT TGGTGTGAA 2160
GAAGCGTCGC AATAGTGCCA CAGAATGGAA CTATAAGGTC AAAAGCCCCA TGGCGACGTA 2220
CCTTGCGACG ATGCAGATAG GCGAATTTAC CGAGTTCAAA CTGCGTCGCA ATACCACCGC 2280
CTGGGCCCCG GGCACCTTGC GTGCGCGTGT GCTGGAAGAA TTC 2323

```

【0029】配列番号：5

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCGACGGTGA GCGCCGACG CAGCGATTTC

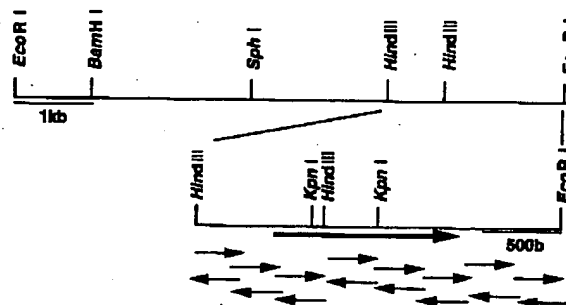
30

【図面の簡単な説明】

【図1】 コリネバクテリウム・アンモニアゲネス染色
体のEcoRI切断6, 300塩基断片の制限酵素地

図。矢印は塩基配列決定の戦略を示す。太矢印は細胞表
層蛋白質構造遺伝子の位置及び方向を示す。

【図1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

// (C12N 15/09

C12R 1:15)

識別記号

ZNA

FI

(C12N 1/21
C12R 1:15)
(C12P 21/02
C12R 1:15)